

Mast cell activation and mediator release : implications for the cardiovascular system

Citation for published version (APA):

Haaster, C. M. C. J. (1996). *Mast cell activation and mediator release : implications for the cardiovascular system*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19960229ch>

Document status and date:

Published: 01/01/1996

DOI:

[10.26481/dis.19960229ch](https://doi.org/10.26481/dis.19960229ch)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

In this thesis, the role of mast cells in acute ischemia/reperfusion and hypoxia/reoxygenation-induced injury to cardiomyocytes is described. This was studied in the isolated, Langendorff-perfused rat heart. In addition, various specific aspects of mast cell activation and mediator release, such as the roles of membrane fatty acid composition, the cytosolic Ca^{2+} concentration and protein tyrosine kinases in the release of histamine and prostanoids, are described. The latter aspects were studied in peritoneal mast cells.

Some general aspects of mast cell activation and mediator release are discussed in **Chapter 1**. Mast cells are inflammatory cells found in various tissues such as lung, heart and skin. Mediators released from these cells play an important role in the clinical signs of hay-fever and asthma. In their secretory granules, mast cells contain a large variety of mediators, such as histamine, which are rapidly released upon activation. In addition, mast cells release a variety of *newly formed* mediators such as prostanoids and hydroxy fatty acids. In order to quantitate the extent of mast cell degranulation, a rapid and highly sensitive High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) method for the determination of histamine in biological samples was developed. This technique was used to determine the amounts of histamine in cardiac tissue, coronary effluents and supernatants of stimulated peritoneal mast cells. Since in most of the techniques for the isolation of peritoneal mast cells described until now, erythrocytes contaminate the final mast cell preparation, a method was developed to isolate these cells from the peritoneal cavity in high purity. This method and the HPLC procedure for the determination of histamine are described in **Chapter 2**.

Certain fatty acids incorporated in membrane phospholipids, such as linoleic or arachidonic acid, serve as precursors for the synthesis of prostanoids and hydroxy fatty acids. We were interested to know to which extent diet-induced changes in mast cell membrane fatty acid composition influenced the formation of prostanoids and hydroxy fatty acids. Therefore, peritoneal mast cells were isolated from rats fed diets which differed in their fatty acid composition (**Chapter 3**). It was found that the formation of prostanoids and hydroxy fatty acids was strongly influenced by diet-induced changes in mast cell phospholipid fatty acid composition. We hypothesized that diet-induced changes in mast cell phospholipid fatty acid composition might influence membrane-related processes such as exocytosis (**Chapter 4**). Although the different dietary fats induced major changes in the fatty acid composition of mast cell phospholipids, no differences in compound 48/80-induced histamine release were observed. It was concluded that the extent of mast cell degranulation was independent of the fatty acid composition of membrane phospholipids.

In **Chapter 5**, the role of the cytosolic Ca^{2+} concentration and protein tyrosine kinases in the differential release of histamine and PGD_2 in mast cells is described. Mast cells were stimulated with the G protein-activating compound 48/80, with thapsigargin, an inhibitor of endomembrane Ca^{2+} -ATPases, with the Ca^{2+} ionophore ionomycin or with the Mg^{2+} -free form of ATP, ATP^{4-} . It was found that stimulation of the cells with compound 48/80 evoked a high histamine secretion and a low PGD_2 release, whereas the Ca^{2+} mobilizers thapsigargin and ionomycin evoked a low histamine secretion and a high release of PGD_2 . Despite prolonged high levels of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ATP^{4-} did not evoke a

substantial release of histamine or PGD₂. In the absence of extracellular CaCl₂, *i.e.*, in those cases in which the influx of extracellular Ca²⁺ was absent, agonist-induced rises in [Ca²⁺]_i as well as histamine secretion and PGD₂ release were significantly reduced. In addition, it was found that the release of histamine was much more influenced by inhibitors of protein tyrosine kinases than the release of PGD₂. It was concluded that the store-regulated influx of extracellular Ca²⁺ amplified agonist-induced rises in [Ca²⁺]_i as well as histamine secretion and PGD₂ release. The differential release of histamine and PGD₂ appeared not to be due to differences in the increase in [Ca²⁺]_i, but rather to a different involvement of protein tyrosine kinases in both processes.

The heart has been shown to contain a resident population of mast cells of which the (patho-)physiological role is largely unknown. It has been suggested that in the heart *ex vivo*, mast cells play a role in hypoxia/reoxygenation-induced injury to cardiac muscle cells. However, there is considerable doubt about the marker used to quantitate the extent of mast cell degranulation. Mast cells have also been proposed to play a role in ischemia/reperfusion-induced myocardial injury *in vivo*. We firstly studied to which extent mast cells were involved in *acute* ischemia/reperfusion-induced injury to cardiomyocytes (**Chapter 6**). Therefore, hearts isolated from non-sensitized, control rats or sensitized rats, were perfused according to Langendorff. During normoxic perfusion, hearts were challenged with antigen, a procedure which is known result in a massive mast cell degranulation in sensitized hearts. After 20 min, hearts were subjected to 30 min of global ischemia followed by 30 min of reperfusion. Since injury to cardiomyocytes results in a rapid leakage of lactate dehydrogenase (LDH), the activity of this enzyme was determined in coronary effluents in order to quantitate the extent of irreversible damage to these cells. During reperfusion, no differences in LDH release between control hearts and 'mast cell-depleted hearts' were found. Thus, the results provided no evidence that in this model, mast cells were prominently involved in *acute* ischemia/reperfusion-induced injury to cardiomyocytes.

The role of mast cells in acute hypoxia/reoxygenation-induced injury to cardiomyocytes was studied using histamine as a marker of mast cell degranulation (**Chapter 7**). Isolated, Langendorff-perfused rat hearts were subjected to 35 min of normoxic perfusion, followed by 60 min of hypoxic perfusion and 30 min of reoxygenation. The activities of LDH or creatine kinase (CK) were determined in coronary effluents in order to quantitate the extent of (irreversible) injury cardiomyocytes. Special attention was paid to the suitability of peroxidase (PO) as a marker of mast cell degranulation. During reoxygenation, the release of LDH, CK and PO did not correlate to that of histamine. When hearts were perfused in the presence of the mast cell stabilizer Iodoxamide, histamine release during reoxygenation significantly decreased, whereas the release of LDH, CK or PO remained unchanged. Determination of PO-activity in isolated cardiomyocytes learned that the bulk of PO-activity in the heart was located in these cells and not in mast cells. Therefore, it was concluded that in the isolated rat heart, PO release was not a suitable marker to indicate the extent of mast cell degranulation. In addition, the results provided no evidence that in this model, mast cells were prominently involved in the extent of *acute* hypoxia/reoxygenation-induced injury to cardiomyocytes.

In tissues such as rat mesenterium and hamster cheek pouch, products released from mast cells have been found to play a prominent role in the expression of endothelial leukocyte-adhesion molecules and leukocyte infiltration. In the process of leukocyte-adhesion, the interaction between endothelial leukocyte-adhesion molecules, such as ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin with their respective counterparts on circulating leukocytes is an important step. Until now, information about the role of mast cells in the adhesion of leukocytes to cardiac endothelium is lacking. The role of mast cells in the induction of endothelial leukocyte-adhesion molecules in the heart *in vivo* was approached in an *in vitro* rat experimental model (**Chapter 8**). Peritoneal mast cells were studied for their capacity to induce the expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in cultured endothelial cells. For ICAM-1 and VCAM-1 studies, rat heart endothelial cell (RHEC) lines were used. For E-selectin studies, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used, since no suitable rat E-selectin antibodies for the rat system were available. Mast cells were incubated either in direct cell-cell contact with endothelial cells or were separated from these cells through a permeable membrane. It was found that in both conditions, products released from mast cells increased the expression of VCAM-1 and E-selectin, and to a minor extent, that of ICAM-1 in endothelial cells. The direct contact between mast cells and endothelial cells significantly promoted the expression of these leukocyte-adhesion molecules. It was concluded that the induction of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin by endothelial cells was not related to the extent of mast cell degranulation, but seemed to be evoked by the release of a(n), so far, undefined substance(s) other than histamine, constitutively released from mast cells.

In **Chapter 9** the results described in this thesis are summarized and discussed in a broader perspective.

| SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt de rol van mestcellen in acute ischemie/reperfusie en hypoxie/reoxygenatie-geïnduceerde schade aan hartspiercellen beschreven. Dit werd bestudeerd in het geïsoleerde, Langendorff-geperfundeerde rattehart. Tevens worden enkele aspecten van mestcel-activatie en het vrijstellen van mediators beschreven. Met name op de rol van de vetzuursamenstelling van het celmembran, de intracellulaire calcium concentratie en tyrosine kinases in de vrijstelling van histamine en prostanoïden wordt nader ingegaan. Deze laatste aspecten werden bestudeerd in peritoneale mestcellen.

Enkele algemene aspecten van mestcellen en het vrijstellen van mediators worden beschreven in **Hoofdstuk 1**. Mestcellen zijn ontstekingscellen die in verschillende weefsels, zoals long, hart en huid worden aangetroffen. Mediators die door deze cellen vrijgesteld worden, spelen een belangrijke rol in de klinische verschijnselen van hooikoorts en astma. In de granules van deze cellen bevinden zich vele mediators, zoals histamine, die snel vrijgesteld kunnen worden als de cel wordt geactiveerd. Tevens kunnen mestcellen een aantal mediators vrijstellen, die *nieuw* door de cel worden gemaakt, zoals bijvoorbeeld de prostanoïden en hydroxyvetzuren. Om de mate van mestceldegranulatie te kwantificeren, werd een methode ontwikkeld om de hoeveelheid histamine in biologische monsters te bepalen. Deze methode, die gebruik maakt van hoge druk vloeistofchromatografie (HPLC), werd gebruikt om de hoeveelheid histamine in hartspierweefsel, coronaire effluents en supernatanten van gestimuleerde mestcellen te bepalen. Omdat in de meeste methodes voor de isolatie van peritoneale mestcellen die tot nu beschreven zijn, erythrocyten meestal in het uiteindelijke mestcelpreparaat aanwezig zijn, werd een methode ontwikkeld om mestcellen in hoge zuiverheid uit de buikholte te isoleren. Deze procedure en de HPLC methode voor de bepaling van histamine worden beschreven in **Hoofdstuk 2**.

Bepaalde vetzuren die ingebouwd zijn in membraanfosfolipiden, zoals linolzuur of arachidonzuur, kunnen worden gebruikt voor de synthese van prostanoïden en hydroxyvetzuren. Wij onderzochten in hoeverre de vorming van prostanoïden en hydroxyvetzuren in mestcellen beïnvloed werd door dieet-geïnduceerde veranderingen in de vetzuursamenstelling van membraanfosfolipiden. Daarom werden peritoneale mestcellen geïsoleerd uit ratten die gevoed waren met diëten van een verschillende vetzuursamenstelling (**Hoofdstuk 3**). Het bleek dat de vorming van prostanoïden en hydroxyvetzuren in mestcellen sterk beïnvloed werd door dieet-geïnduceerde veranderingen in de vetzuursamenstelling van membraanfosfolipiden. In **Hoofdstuk 4** wordt de rol van de vetzuursamenstelling van membraanfosfolipiden in de mate van mestceldegranulatie beschreven. Ondanks dat de verschillende dieetvetten belangrijke veranderingen in de vetzuursamenstelling van mestcelfosfolipiden induceerden, werden er geen belangrijke veranderingen waargenomen in de mate van compound 48/80-geïnduceerde vrijstelling van histamine. Daarom werd geconcludeerd dat de mate van mestceldegranulatie onafhankelijk was van de vetzuursamenstelling van membraanfosfolipiden.

In **Hoofdstuk 5** wordt de rol van de intracellulaire Ca^{2+} concentratie en tyrosine kinases in de differentiële vrijstelling van histamine en PGD_2 in mestcellen beschreven. Mestcellen werden gestimuleerd met het G eiwit-activerende compound 48/80, met

thapsigargine, een remmer van Ca^{2+} -ATPases, met de Ca^{2+} ionofoor ionomycine of met de Mg^{2+} -vrije vorm van ATP, ATP^{4-} . Activatie met compound 48/80 resulteerde in een hoge vrijstelling van histamine en een lage vrijstelling van PGD_2 , terwijl activatie met thapsigargine of ionomycine resulteerde in een lage vrijstelling van histamine en een relatief hoge vrijstelling van PGD_2 . Ondanks langdurig hoge intracellulaire Ca^{2+} concentraties ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), resulteerde incubatie met ATP^{4-} niet in een substantiële vrijstelling van histamine of PGD_2 . In de afwezigheid van extracellulair CaCl_2 (= in de afwezigheid van influx van extracellulair Ca^{2+}), daalden de agonist-geïnduceerde toenames in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en de vrijstelling van histamine en PGD_2 . Het bleek dat de vrijstelling van PGD_2 veel sterker beïnvloed werd door remmers van tyrosine kinases dan de vrijstelling van histamine. Er werd geconcludeerd dat de influx van extracellulair Ca^{2+} zowel de agonist-geïnduceerde stijgingen van $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als de vrijstelling van histamine en PGD_2 verhoogde. De differentiële vrijstelling van histamine en PGD_2 bleek niet afhankelijk van verschillende stijgingen van $[\text{Ca}^{2+}]_i$, maar eerder van een verschillende rol van tyrosine kinases in beide processen.

Het hart bevat een residente populatie van mestcellen, waarvan de pathofysiologische rol vrijwel onbekend is. Resultaten van een *ex vivo* studie hebben gesuggereerd dat mestcellen een rol zouden kunnen spelen in acute hypoxie/reoxygenatie-geïnduceerde schade aan hartspiercellen. Er bestaat echter grote twijfel over de maat die gebruikt werd om de mate van mestceldegranulatie te kwantificeren. Er zijn aanwijzingen dat mestcellen ook een rol spelen in ischemie/reperfusie-geïnduceerde hartspierschade *in vivo*. Wij hebben allereerst bestudeerd in hoeverre mestcellen een rol spelen in acute ischemie/reperfusie-geïnduceerde schade aan hartspiercellen (**Hoofdstuk 6**). Harten die geïsoleerd waren uit niet-gesensitiseerde, controle ratten of uit gesensitiseerde ratten werden geperfundeed volgens Langendorff. Gedurende de normoxische perfusie werd aan alle harten antigeen toegediend, waarvan bekend is dat het leidt tot een massale mestceldegranulatie in gesensitiseerde harten. Na 20 min normoxische perfusie werden alle harten onderworpen aan 30 min ischemie gevolgd door 30 min reperfusie. Omdat schade aan hartspiercellen leidt tot het lekken van lactaat dehydrogenase (LDH), werd de activiteit van dit enzym bepaald in coronaire effluenten om de mate van irreversibele schade aan deze cellen te kwantificeren. Tijdens de reperfusie-fase werden geen verschillen waargenomen in de mate van LDH-vrijstelling tussen de controle en de gesensitiseerde harten. De resultaten leverden geen bewijs dat mestcellen in dit model een belangrijke rol speelden in de mate van *acute* ischemie/reperfusie-geïnduceerde schade aan hartspiercellen.

De rol van mestcellen in acute hypoxie/reoxygenatie-geïnduceerde schade aan hartspiercellen werd bestudeerd door histamine als maat voor mestceldegranulatie te gebruiken (**Hoofdstuk 7**). Geïsoleerde, Langendorff-geperfundeerde harten werden onderworpen aan 35 minuten normoxische perfusie, gevolgd door 60 minuten hypoxische perfusie en 30 minuten reoxygenatie. De activiteiten van LDH en creatine kinase (CK) werden bepaald in coronaire effluenten om de mate van irreversibele schade aan hartspiercellen te kwantificeren. Speciale aandacht werd besteed aan de geschiktheid van peroxidase (PO) als maat voor mestceldegranulatie. Gedurende de

reoxxygenatie-fase werd geen correlatie gevonden tussen de vrijstelling van LDH, CK en PO, en de mate van histamine vrijstelling. Wanneer harten geperfundeed werden in de aanwezigheid van de mestcelstabilisator Iodoxamide, daalde gedurende de reoxxygenatie-fase de vrijstelling van histamine, maar de vrijstelling van LDH, CK en PO bleef onveranderd. Bepaling van de PO-aktiviteit in geïsoleerde hartspiercellen toonde aan de meerderheid van PO-aktiviteit in het hart gelokaliseerd was in deze cellen en niet in mestcellen. Daarom werd geconcludeerd dat de vrijstelling van PO in dit model geen geschikte maat was om de mate van mestceldegranulatie te bepalen. Tevens leverden deze resultaten geen bewijs dat mestcellen een belangrijke rol spelen in de mate van acute hypoxie/reoxxygenatie-geïnduceerde schade aan hartspiercellen.

In weefsels, zoals het mesenterium van de rat of de hamster-wangzak, is het aangetoond, dat mediators die vrijgesteld worden door mestcellen betrokken zijn in de expressie van leukocyt-adhesie moleculen en leukocyt-infiltratie. In het proces van leukocyt-adhesie speelt de interactie tussen endotheliale leukocyt-adhesie moleculen, zoals ICAM-1, VCAM-1 en E-selectine met hun respectievelijke liganden op circulerende leukocyten, een belangrijke rol. Tot nu toe is er niets bekend over de rol van mestcellen in de adhesie van leukocyten aan hart endotheel. De rol van mestcellen in de inductie van endotheliale leukocyt-adhesie moleculen *in vivo*, werd bestudeerd in een *in vitro* rat experimenteel model (**Hoofdstuk 8**). Daartoe werd gekeken in hoeverre peritoneale mestcellen in staat waren om de expressie van ICAM-1, VCAM-1 of E-selectine op gekweekte endotheelcellen te induceren. Voor ICAM-1 en VCAM-1 studies werden lijnen van rattehart endotheelcellen (RHEC) gebruikt, terwijl voor de E-selectine studies humane navelstreng endotheelcellen (HUVEC) werden gebruikt, omdat E-selectine antilichamen voor het rat-systeem niet beschikbaar waren. Mestcellen werden geïncubeerd in direct 'cel-cel' contact met endotheelcellen óf ze werden van deze cellen gescheiden door middel van een permeabel membraan. Het bleek dat in beide condities, stoffen die door mestcellen werden vrijgesteld, de expressie van VCAM-1 en E-selectine, en in mindere mate van ICAM-1, op endotheelcellen konden verhogen. Het directe contact tussen mestcellen en endotheelcellen veroorzaakte een significante stijging van de expressie van deze leukocyt-adhesie moleculen. De inductie van ICAM-1, VCAM-1 en E-selectine was niet gerelateerd aan de mate van mestceldegranulatie, maar bleek veroorzaakt te worden door (een) stof(fen) anders dan histamine, die constitutief door mestcellen werd(en) vrijgesteld.

In **Hoofdstuk 9** worden de resultaten zoals beschreven in dit proefschrift samengevat en in een breder kader geplaatst.